

Traitement de l'infection expérimentale de la souris par *Mycobacterium ulcerans* et *Mycobacterium balnei*

PAR

S. R. PATTYN et J. ROYACKERS

Résumé — Chez la souris la Streptomycine et la DDS empêchent le développement de lésions cliniques après inoculation de *M. ulcerans* et *M. balnei* dans la plante des pieds. Néanmoins, après arrêt du traitement, des lésions se développent chez les animaux ayant reçu la DDS et des bacilles sensibles à la Streptomycine persistent dans les pattes chez les animaux traités par cet antibiotique. La Cyclosérine retarde l'évolution des symptômes, tandis que le Bayer 205, l'INH et le PAS sont sans effet.

Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle l'échec du traitement médicamenteux chez l'homme serait principalement dû au fait que dans les ulcères la plus grande partie des *M. ulcerans* sont non-viables.

Un traitement à la Streptomycine ou à la DDS pourrait néanmoins être utile dans la prévention des récurrences ou métastases après traitement chirurgical.

Les ulcères à *Mycobacterium ulcerans* observés au Congo ont tous dû être traités chirurgicalement, aucun traitement médical n'apportant une amélioration des lésions (Janssens *et al.*, 1958; Janssens *et al.*, 1959). Pourtant ces germes sont sensibles *in vitro* à l'action de plusieurs tuberculostatiques.

Ainsi avons-nous voulu vérifier l'effet de divers tuberculostatiques dans l'infection expérimentale de la souris par une souche congolaise de *M. ulcerans*. Parallèlement, nous avons fait le même essai avec une souche de *M. balnei* dont le comportement dans la patte de souris est analogue.

Matériel et techniques

M. ulcerans : la souche 152 fut utilisée; elle a été décrite antérieurement (Pattyn *et al.*, 1964).

M. balnei : nous avons travaillé avec une souche isolée au Colorado U. S. A.; cette souche nous a été adressée par Middelbrook, (Schaefer *et al.*, 1961).

Les résultats des tests de sensibilité *in vitro* vis-à-vis des tuberculostatiques furent les suivants pour les deux souches utilisées.

	N° 152 (<i>M. ulcerans</i>)	N° 200 (<i>M. balnei</i>)
Contrôle	++	++
SM 5 γ /cc	0	+
SM 10 γ /cc	0	0
SM 50 γ /cc	0	0
INH 1 γ /cc	++	
INH 5 γ /cc	++	++
INH 10 γ /cc	++	
PAS 10 γ /cc	+	++
PAS 50 γ /cc	++	++
Cyclo 5 γ /cc	0	+
Cyclo 20 γ /cc	0	
Cyclo 50 γ /cc	0	+

Les souris furent inoculées par voie sous cutanée (s. c.) avec une suspension de 1mg/ml (poids humide) dans de l'eau physiologique à raison de 0,03 ml dans la plante des pieds postérieurs et de 0,02 ml dans la queue.

Les produits tuberculostatiques furent administrés dès le lendemain de l'infection à des groupes de dix souris dans les conditions suivantes :

- Hydrazide d'acide nicotinique (INH) 0,02 p. cent dans la nourriture.
- Cyclosérine (*) à 0,2 p. cent dans la nourriture.
- 4-4 diaminodiphénylsulfone (DDS) (*) 0,1 p. cent dans la nourriture.
- Acide paraamino salicylique (PAS) 0,6 p. cent dans la nourriture.
- Streptomycine : injections s. c. quotidiennes six jours consécutifs sur sept de 3 mg par souris.
- Bayer 205 injection s. c. de 0,1 ml d'une solution à 1 p. cent deux fois par semaine.

Un groupe de souris témoins reçut la même nourriture sans adjonction de médicaments. Toutes les souris reçurent de l'eau à volonté.

Les animaux furent examinés journallement.

Au moment où le gonflement érythémateux nous parut sur le point de s'ulcérer, les animaux furent tués et des frottis des lésions colorées au Ziehl, afin de nous assurer de la nature spécifique de ces lésions.

Dans certains cas, des rétrocultures *in vitro* furent effectuées comme il sera indiqué plus loin.

(*) Nous remercions les firmes Roche (Bâle, Suisse) et I. C. I. (Macclesfield, Angleterre) d'avoir mis gracieusement à notre disposition respectivement la cyclosérine et la DDS.

Résultats

A. *M. ulcerans*

Dans le groupe de souris témoins, un érythème se développa au niveau de la queue à partir du 38^e jour, puis, pendant les jours suivants des lésions apparurent au niveau des pattes. La première partie de l'expérience, c'est-à-dire celle comportant l'administration des produits tuberculostatiques, fut arrêtée au 48^e jour. La situation, à ce moment, est rapportée dans la deuxième colonne du tableau 1.

TABLEAU 1

Evolution chez la souris des lésions cliniques par *M. ulcerans*, sous l'influence de divers produits tuberculostatiques

	48 ^e jour	+ 10 jours sans traitement	+ 36 jours sans traitement	+ 42 jours sans traitement
Témoins	9/9	—	—	—
Bayer 205	9/9	—	—	—
SM	0/10	0/8	0/8	0/8
INH	10/10	—	—	—
Cyclo	5/8 (*)	8/8	—	—
DDS	0/9	0/8	8/8	—

(*) Numérateur : souris avec lésions cliniques prononcées, dénominateur : nombre de souris testées.

Les pattes de souris témoins étaient fortement gonflées et très riches en bacilles acido-résistants (BAR).

Les souris traitées à l'INH et au Bayer 205 étaient tout aussi positives. Par contre, les animaux traités à la Streptomycine et la DDS étaient absolument normales. Deux souris traitées au DDS et une traitée à la Streptomycine furent tuées et les pattes examinées après coloration de Ziehl. Cet examen fut négatif.

On constatait, de plus, un retard dans le développement des lésions chez les souris sous l'influence de la cyclosérine. Trois sur huit étaient normales tandis que chez les autres on nota deux fois un léger gonflement des pattes et trois fois un érythème au niveau de la queue.

A partir du 48^e jour, tout traitement fut arrêté, tandis que l'observation des souris des groupes traités par la SM, la DDS et la Cyclo-sérine continuait.

Dix jours plus tard, les souris traitées par la DDS et la SM, étaient toujours normales mais l'infection dans le groupe traité par la Cyclo-sérine avait évolué au point qu'il fallut sacrifier ces animaux.

Un mois après l'arrêt du traitement, les souris ayant reçu de la DDS pendant les premiers 48 jours, développèrent également des lésions. Par contre les souris qui avaient été traitées à la Streptomycine étaient toujours parfaitement normales deux mois après l'arrêt du traitement.

A ce moment l'expérience fut arrêtée, les pattes des souris broyées, les frottis examinés après coloration selon Ziehl. De rares BAR furent découverts. Une suspension préparée à partir de deux pattes fut ensemencée sur deux tubes de milieu selon Löwenstein-Jensen sans et après décontamination à la soude à 4 p. cent. Des colonies se développèrent sur les milieux inoculés au moyen de la suspension non traitée à la soude. Les germes se révélèrent être sensibles à la Streptomycine *in vitro* à la concentration de 5 mcg/ml comme les germes de départ.

B. *M. balnei*

Les résultats de l'expérience avec *M. balnei* figurent au tableau 2.

TABLEAU 2
Evolution chez la souris des lésions cliniques par *M. balnei*,
sous l'influence de divers tuberculostatiques

	10 jours	15 jours
Témoin	7/10	10/10
Bayer 205	7/10	10/10
SM	0/9	0/9
INH	6/10	9/9
Cyclo	7/9	9/9
DDS	0/8	0/8
PAS	9/10	10/10

Les premières lésions apparurent chez la plupart des souris du groupe témoin au 10^e jour, et toutes étaient fortement atteintes au 15^e jour.

L'expérience fut arrêtée au 15^e jour, seules les souris traitées à la Streptomycine et à la DDS étaient normales. Néanmoins chez deux souris sur trois du groupe traité à la Streptomycine des BAR furent trouvés dans les pattes. Des rétrocultures *in vitro* ne furent pas faites.

Discussion

Nous avons inclu le Bayer 205 dans cette expérimentation parce que ce produit influence certaines infections expérimentales à mycobactéries. En effet, Hilson et Elek (1957) et Rees et Hart (1956) ont montré que le Bayer 205 active la multiplication de *M. leprae-murium* chez la souris, mais freine la multiplication chez le rat. *M. tuberculosis* se développe également plus activement chez la souris sous l'influence du Bayer 205 tandis que la tuberculose humaine serait favorablement influencée. Plusieurs auteurs ont recherché vainement un effet du Bayer 205 sur l'infection expérimentale de la souris par *M. leprae* (Pattyn *et al.*, 1964; Shepard, Rees, communication personnelle).

Dans le cas de l'infection expérimentale de la souris par *M. ulcerans* et *M. balnei*, nous n'avons pas non plus constaté d'action du Bayer 205 dans les conditions utilisées. Feldman et ses collaborateurs (1957), travaillant avec une souche australienne de *M. ulcerans*, injectèrent leurs souris par la voie intraveineuse — ce qui donne un temps d'incubation plus long — et ont observé un effet protecteur de la part de la SM et de la DDS, tandis que l'INH n'avait qu'un effet partiel.

Dans nos expériences, de tous les produits essayés seuls la DDS et la SM sont donc capables de prévenir les lésions expérimentales à *M. ulcerans* et *M. balnei* chez la souris. La Cyclosérine retarde légèrement l'évolution des lésions dues à *M. ulcerans*.

Ces résultats concordent assez bien avec les résultats de la détermination de la sensibilité de ces germes *in vitro*, la seule discordance notable étant observée avec la Cyclosérine dans l'infection à *M. ulcerans*, les germes se montrant plus sensibles à ce produit *in vitro* que *in vivo*.

Ce phénomène a été observé également pour ce produit dans le domaine de la tuberculose (Dumittar, 1960).

Nos résultats montrent néanmoins que certains produits tuberculostatiques agissent sur le *M. ulcerans*, *in vivo*. L'échec du traitement médicamenteux doit donc être recherché ailleurs.

Nous avons exposé dans un autre travail (Pattyn *et al.*, 1963) qu'un très grand nombre de BAR trouvés dans les lésions, sont, en réalité, des germes non viables. Ils échappent de ce fait à

l'action de tuberculostatiques. Il semble donc qu'il faille admettre que les lésions anatomo-cliniques sont en partie dues à des germes non viables. D'autre part, la nécrose étendue des lésions pourrait constituer un obstacle supplémentaire à la pénétration efficace des médicaments. Le fait que nous pouvons enrayer les lésions expérimentales à l'aide de la Streptomycine constitue un argument en faveur de cette thèse.

Nos résultats montrent également que le traitement à la Streptomycine, qui devrait sans doute être fort prolongé — pourrait être intéressant dans la *prévention* des récidives après traitement chirurgical. Ces récidives et métastases ont été particulièrement nombreuses dans un cas décrit récemment (Janssens *et al.*, 1963) et sont observés de plus en plus fréquemment à Léopoldville (Vandepitte, communication personnelle).

Samenvatting — Streptomycine en DDS behandeling van muizen, in de voetzool ingeënt met *M. ulcerans* en *M. balnei*, verhindert het optreden van klinische letsels. Bij stopzetten der behandeling echter ontstaan wel letsels waaruit SM gevoelige kiemen kunnen worden gekweekt. Cycloserine vertraagt het optreden der letsels terwijl Bayer 205, INH en PAS geen uitwerking hebben.

Deze resultaten zijn in overeenstemming met de hypothese dat de mislukkingen der medicamenteuze behandeling bij de mens toe te schrijven zou zijn aan het feit dat een groot gedeelte der *M. ulcerans* kiemen in deze letsels niet leefbaar zouden zijn.

SM en DDS behandeling zouden niettemin nuttig kunnen zijn om recidieven of metastasen te voorkomen na chirurgische behandeling.

Summary — In mice streptomycin and DDS prevent the development of clinical lesions after inoculation of *M. ulcerans* and *M. balnei* into the foot pads. However after treatment is stopped lesions develop in animals given DDS, and bacilli sensitive to streptomycin persist in the pads of animals treated by this antibiotic. Cycloserine retards the evolution of the symptoms while Bayer 205, INH and PAS are ineffective.

These results seem to confirm the hypothesis according to which the failure of medical treatment in man is due principally to the fact that the great majority of *M. ulcerans* in the ulcers are non-viable.

Nevertheless streptomycin or DDS treatment can be useful in preventing relapses or metastases after surgical treatment.

Zusammenfassung — Bei der Maus wird nach Inokulation von *M. ulcerans* und *M. balnei* in die Fusssohle die Entwicklung klinischer Veränderungen durch Gabe von Streptomycin und DDS verhindert. Nach Aufhören der Behandlung entwickeln sich jedoch die Läsionen bei den Versuchstieren, die DDS erhielten, weiter, und die gegenüber Streptomycin empfindlichen Bazillen in den Pfoten der mit diesem Antibioticum behandelten Tiere persistieren. Cycloserin verzögert die Entwicklung der Symptome, während Bayer 205, INH und PAS ohne Wirkung sind.

Diese Ergebnisse scheinen die Hypothese zu bestätigen, nach der das Versagen der Therapie beim Menschen hauptsächlich darauf beruht, dass in den Geschwüren die Mehrzahl von *M. ulcerans* nicht lebensfähig ist.

Eine Behandlung mit Streptomycin oder DDS könnte trotzdem für eine Verhütung von Rezidiven oder Metastasen nach chirurgischer Behandlung nützlich sein.

Resumen — En el ratón la estreptomycinina y la DDS impiden el desarrollo de lesiones clínicas despues de inoculation de *M. ulcerans* y *M. balnei* en la planta de los pies. Sin embargo, despues de suprimir el tratamiento, las lesiones se desarrollan en los animales tratados con la DDS y bacilos sensibles a la estreptomycinina persisten en las patas de los animales tratados por este antibiotico. La cicloserina retarda la evolución de los síntomas en tanto que el Bayer 205, el INH y el PAS quedan sin efecto.

Estos resultados parecen confirmar la hipótesis, según la cual el fracaso del tratamiento medicamentoso en el hombre sería principalmente debido al hecho que, en las úlceras, la mayoría de los *M. ulcerans* no son viables.

Un tratamiento con estreptomycinina o DDS podría, sin embargo, ser útil en la prevención de recidivas o metástasis despues del tratamiento quirúrgico.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de bactériologie de l'Institut de Médecine tropicale Prince Léopold à Anvers et reçu pour publication le 4 mars 1964.

BIBLIOGRAPHIE

- Dumittar, S. H., Le rôle de la D cyclosérine dans le traitement médicamenteux de la tuberculose. *Helv. Med. Acta*, 1960, **27**, 65-118.
- Feldman, W. H. et Karlson, A. G., *M. ulcerans* infections. Response to chemotherapy in mice. *Am. rev. Tub.*, 1957, **75**, 266-279.
- Hilson, G. R. F. et Elek, S. D., Intratesticular multiplication of *M. lepraemurium* in normal an suramin treated animals. *Int. J. Lepr.*, 1957, **25**, 380.
- Janssens, P. G., Pattyn, S. R., Boveroulle, M. T., Quertinmont, M. J. et De Muynck, A., Un ulcère nécrotique originaire du Bas-Katanga. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1963, **5**, 729-738.
- Janssens, P. G., Quertinmont, M. J., Sieniawski, J. et Gatti, F., Necrotische tropenzweer en nieuwe mycobacteriele verwekkers. *Verh. Koninkl. Vl. Akad. Geneesk. België*, 1958, **20**, 420-439.
- Janssens, P. G., Quertinmont, M. J., Sieniawski, J. et Gatti, F., Necrotic tropical ulcers and mycobacterial causative agents. *Trop. geogr. Med.*, 1959, **11**, 294-312.
- Pattyn, S. R., Boveroulle, M. T., Gatti, F. et Vandepitte, J., Etude des souches de *M. ulcerans* isolées au Congo. *Bull. Acad. Roy. Sci. Outre-mer*, 1964, 1576-1599.
- Pattyn, S. R. et Janssens, P. G., Experience with mouse inoculations of leprosy bacilli originating from the Congo. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1965, **45**, 1, 9-16.
- Rees, R. J. W. et d'Arcy Hart, P., Enhancement of experimental tuberculosis in the mouse by suramin. *Tubercle*, 1956, **37**, 327-332.
- Schaefer, W. B. et Davis, C. L., A bacteriological and histopathological study of skin granuloma due to *M. balnei*. *Am. Rev. Dis.*, 1961, **84**, 837-844.